



Universidade de  
Aveiro  
Ano 2011

Departamento de Biologia

**Poliana Vanessa  
Monteiro Pinto e  
Silva**

**Efeitos combinados de desreguladores  
endócrinos em *Daphnia magna***



**Universidade de  
Aveiro**  
Ano 2011

Departamento de Biologia

**Poliana Vanessa  
Monteiro Pinto e  
Silva**

**Efeitos combinados de desreguladores  
endócrinos em *Daphnia magna***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Catarina Isabel Guerra Rodrigues de Mansilha do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, IP, e do Professor Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **o júri**

Presidente do júri

**Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso**  
Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Vogais:

**Professora Doutora Susana Patrícia Mendes Loureiro**  
(Arguente) Investigadora Auxiliar, CESAM e Departamento de  
Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutora Catarina Isabel Guerra Rodrigues de Mansilha**  
(Orientadora) Investigadora Auxiliar e Responsável pelo Laboratório  
de Química e Toxicologia no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo  
Jorge, IP

**Professor Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares**  
(Co-orientador) Professor Catedrático na Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

À Catarina, Isabela e Lurdes, minhas queridas, do INSA, IP. indispensáveis na realização deste trabalho.

À Manuela, Isabel, Carla Coelho, Carla Marques, Alcina, Fátima, Cristina, Luísa, Zara e restantes colaboradoras do INSA, IP pelo carinho.

Aos Profissionais de Segurança do INSA, IP pela amabilidade comigo e com as *Daphnia magna*.

Ao Abel Ferreira do CESAM, Universidade de Aveiro pelo apoio incondicional, bem como o meu co-orientador Amadeu Soares.

Ao Pedro, Rosa, Afonso, Joana e Baker pelo amor e paciência.

A todos os meus amigos e colegas que me facilitaram o percurso até aqui.

## palavras-chave

atrazina, benzo[a]pireno, estradiol, desreguladores endócrinos, ensaio em mistura, *Daphnia magna*, água para consumo humano.

## resumo

O planeta encontra-se inevitável e irremediavelmente exposto a um *cocktail de misturas*, afectando assim os sistemas aquáticos bem como o Homem. Os ensaios toxicológicos são o apoio fundamental que a ciência dispõe para a previsão estimada da toxicidade de um composto. Cerca de 70% do planeta é constituído por água, água essa que é consequência da acção de poluentes com um número infindável de compostos. Nos seres humanos, 90% dos poluentes ambientais são absorvidos através de alimentos e água contaminada. Os químicos capazes de causar desregulação endócrina pertencem a vários grupos de poluentes que se encontram em íntimo contacto com a biota. Os poluentes designadamente a atrazina, estradiol e benzo[a]pireno são os três compostos mais representativos da classe dos pesticidas, estrogénios e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Estudos indicam prevalência de células cancerígenas, mas também apresentam consequências nefastas a nível do sistema endócrino. Alguns DEs já se encontram regulamentados através de directivas comunitárias e legislação nacional para águas de consumo humano, no entanto, o estradiol não está contemplado, visto existirem lacunas quanto a estudos desenvolvidos com este composto. Através dos ensaios de toxicidade, as organizações da união europeia e agências para a protecção ambiental estabelecem limites de segurança permitidos para cada composto. Com o objectivo principal de avaliar o impacto da atrazina, estradiol e benzo[a]pireno, utilizando o organismo-teste *Daphnia magna*, realizaram-se testes toxicológicos agudos simples e em misturas. Os ensaios toxicológicos simples encontram-se em concordância com os descritos por autores, para valores de EC50. Nos testes toxicológicos em misturas, observou-se um aumento de toxicidade para os três compostos; particularmente a atrazina em que se observou uma toxicidade superior a 99%. No estradiol observou-se um aumento superior a 90%, e no benzo[a]pireno, um aumento superior a 75%. Nesta avaliação também foi fulcral a comparação com o valor do NOEC, valor imprescindível (entre outros factores) para o cálculo dos limites de segurança permitidos. O EC50 e EC5 obtidos nas misturas, comportaram-se de forma consideravelmente inferior ao NOEC obtido a partir dos ensaios simples. Após o término deste período de teste, as *D. magna* vivas no controlo e concentrações de poluentes utilizados na primeira mistura, foram transferidas para meio ASTM onde foram cultivadas de acordo com as normas regulamentadas durante quatorze dias. Mesmo em meio de cultura adequado á sua optima manutenção, e encontrando-se expostas aos químicos apenas por 48 horas, apresentaram sinais de malformação ocular e reprodutiva. Embora os valores paramétricos referentes a águas de consumo humano para a atrazina e benzo[a]pireno apresentem segurança face aos resultados; o estradiol poderá ser um risco para a saúde humana e para os ecossistemas. Este estudo demonstra a necessidade urgente de estabelecer normas que protejam a integridade da biodiversidade a nível não só do químico estradiol mas dos demais DEs, que poderão ser potenciados pela adição de outros compostos com a mesma toxicocinética.

**keywords**

atrazine, benzo[a]pyrene, estradiol, endocrine disrupters, chemical mixture toxicology, *Daphnia magna*, drinking water.

**abstract**

The planet is inevitable and irreparably exposed to a *cocktail of mixtures*, thereby affecting aquatic systems and the Human Being. The toxicological trials are the fundamental support that science has to estimated prediction of the toxicity of a compound. About 70% of the Planet consists in water, water that is a consequence of pollution of an endless number of compounds. In the Human Being, 90% of environmental pollutants are absorbed through the contaminated food and water. The chemicals that can cause endocrine disruption belong to several groups of pollutants that are in intimate contact with the ecosystems. The pollutants namely atrazine, estradiol and benzo[a]pyrene are the three compounds more representative of the pesticides class, polycyclic aromatic hydrocarbons and estrogens. Studies indicate prevalence of cancer cells, but also show harmful consequences at the endocrine system level. Some EDs are already regulated by European Union organizations and the Agency for the environment protection who establishes limits of security allowed for each compound. With the main goal of evaluate the impact of the atrazine, estradiol and benzo[a]pyrene using the test organism *Daphnia magna*, were performed acute toxicological tests with simple compounds and in mixtures. For values of EC<sub>50</sub>, the acute toxicological tests with simple compounds were consistent with those described by authors. Respecting toxicity testing in mixtures, it was observed an increased toxicity for the three compounds; specially atrazine where was observed a toxicity over 99%. In estradiol was observed an increase over 90%, and with benzo[a]pyrene, an increase over 75%. In this evaluation was also relevant the comparison of the value NOEC, important valuable (among other factors) for the calculation of safety limits allowed. The EC<sub>50</sub> and EC<sub>5</sub> obtained for mixtures behaved in a manner considerably inferior than the NOEC obtained from simple experiments. Upon completion of this test period, the living *D. magna* of control and from the first concentration used in mixtures, were transferred to the medium culture ASTM where were cultivated in accordance with standard regulations for more than fourteen days. Even in appropriate medium culture to their grown and exposed to chemicals only for 48 hours, they shown ocular and reproductive malformation signals. Although the parametric values for drinking water to atrazine and benzo[a]pyrene shown security face the results; estradiol can be a risk to the human health and ecosystems. The study shows the urgent need to establish standards protocols that can protect the integrity of the biodiversity at a level not only of the chemical estradiol but also the other EDs that could be enhanced by the addition of other compounds with the same toxic kinetics.

# Índice

<b>Índice .....</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de acrónimos e abreviaturas .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>13</b>
1.1. Poluentes .....	15
1.1.1. Pesticidas .....	15
1.1.2. Estrogénios .....	17
1.1.3. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos .....	18
1.2. Estudos de Ecotoxicidade - <i>Daphnia magna</i> como modelo biológico .....	20
1.2.1. Teste de toxicidade simples vs misturas .....	21
1.3. Objectivos .....	21
<b>2. Materiais e métodos .....</b>	<b>24</b>
2.1. Objecto e Local do estudo .....	24
2.2. Manutenção e cultivo de <i>Daphnia magna</i> .....	24
2.3. Testes toxicológicos agudos .....	24
2.3.1. Condições do método .....	24
2.3.2. Testes agudos de imobilização – OECD 202 .....	25
2.3.2.1. Ensaio simples .....	26
2.3.2.2. Ensaio em misturas .....	27
2.4. Análise estatística .....	28
<b>3. Resultados .....</b>	<b>30</b>
3.1. Teste agudo – ensaio simples .....	30
3.2. Teste agudo – ensaio em misturas .....	33
<b>4. Discussão .....</b>	<b>39</b>

<b>5. Conclusão .....</b>	<b>44</b>
<b>6. Referências.....</b>	<b>46</b>



## Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Concentrações de atrazina, estradiol e benzo[a]pireno utilizadas para o ensaio toxicológico agudo simples com *Daphnia magna*.

---

27

**Tabela 2.** Concentrações de atrazina, estradiol e benzo[a]pireno utilizadas para o ensaio toxicológico em mistura com *Daphnia magna*.

---

28

**Tabela 3.** Comparação entre valores de EC<sub>50</sub> observados, EC<sub>50</sub> após compilação de dados de revisão bibliográfica, NOECs e valores paramétricos (VP) para cada composto estudado.

---

32

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de acção proposto para o pesticida atrazina em anfíbios, células e tecidos do ser humano, peixes e alguns répteis [25-26]	16
<b>Figura 2.</b> Ensaio de toxicidade aguda com dicromato de potássio ( $K_2CrO_4$ ) estipulado pela ISO 6341.	30
<b>Figura 3.</b> Concentração resposta para a atrazina no ensaio simples com <i>D. magna</i> .	31
<b>Figura 4.</b> Concentração resposta para o estradiol no ensaio simples com <i>D. magna</i> .	31
<b>Figura 5.</b> Concentração resposta para o benzo[a]pireno no ensaio simples com <i>D. magna</i> .	32
<b>Figura 6.</b> Ensaio toxicológico agudo utilizado na obtenção da gama de concentrações finais para a implementação do ensaio em mistura dos três compostos.	33
<b>Figura 7.</b> Comparação entre $EC_{50}$ obtido no ensaio simples e em mistura para a atrazina.	34
<b>Figura 8.</b> Comparação entre $EC_{50}$ obtido no ensaio simples e em mistura para o estradiol.	34
<b>Figura 9.</b> Comparação entre $EC_{50}$ obtido no ensaio simples e em mistura para o benzo[a]pireno	35
<b>Figura 10.</b> Comparação entre valores de $EC_5$ E $EC_{50}$ obtidos nos ensaios com misturas, o NOEC obtido através de ensaios simples e o valor paramétrico para a atrazina.	35
<b>Figura 11.</b> Comparação entre valores de $EC_5$ E $EC_{50}$ obtidos nos ensaios com misturas, o NOEC obtido através de ensaios simples e o valor paramétrico para o estradiol.	36
<b>Figura 12.</b> Comparação entre valores de $EC_5$ E $EC_{50}$ obtidos nos ensaios com misturas, o NOEC obtido através de ensaios simples e o valor paramétrico para o benzo[a]pireno.	36
<b>Figura 13 a), b), e c).</b> Figura 13 a) <i>D. magna</i> , exposta durante 48 horas e 14 dias em meio ASTM. Na figura 13 b) verifica-se, após exposição de 48 horas em teste agudo (mistura de químicos) e 14 dias em meio ASTM, a ausência da região ocular. Na figura 13 c) exposta nas mesmas condições que a figura 13 b), verificam-se embriões abortados no interior de <i>D. magna</i> após a sua morte.	37

## Lista de acrónimos e abreviaturas

ASTM	Sociedade Americana de Teste de Materiais
[C]	Concentração
DEs	Desreguladores endócrinos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC	Concentração Efectiva
EPA	Protecção Ambiental dos Estados Unidos da América
HAPs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
INSA, I.P	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Instituto Público
ISO	Organização Internacional para a Padronização
mg/L	Miligramas por litro
mL	Mililitros
MO	Microscópio Óptico
ng/L	Nanogramas por litro
NOEC	Concentração Efectiva sem Efeito Observado
OIT	Organização Internacional do Trabalho
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAHs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PNUA	Programa das Nações Unidas para o Ambiente
UE	União Europeia
VP	Valores Paramétricos
µg/L	Microgramas por litro

## 1. Introdução

---

---

## 1. Introdução

A investigação em ecotoxicologia, nomeadamente a orientada para a avaliação e gestão de riscos, é imprescindível para fundamentar decisões políticas, com o objectivo de protecção e manutenção da Saúde Pública e Ambiental.

Os modelos de desenvolvimento adoptados pelo Homem para a agricultura, a pecuária, a indústria e os centros urbanos nem sempre têm sido devidamente ponderados, gerando problemas, alguns dos quais praticamente irreversíveis e de extrema relevância. Neste contexto, os efeitos nefastos que reconhecidamente diversos poluentes desencadeiam, levaram à eclosão mundial de estudos para os identificar e, sobretudo, para os quantificar no meio ambiente e em amostras biológicas, suscitando alguns deles a necessidade de regulamentação própria protectora [1].

A vida moderna expõe-nos a misturas de químicos com reconhecida toxicidade, alguns dos quais podem interagir directamente com um ou mais componentes do sistema endócrino, tendo sido intitulados de desreguladores ou disruptores endócrinos (DEs) [2].

O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS), que envolve a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Programa das Nações Unidas para o Ambiente (PNUA) e a Organização Internacional do Trabalho (OIT), decidiu adoptar, em conjunto com peritos do Japão, dos Estados Unidos da América, do Canadá, da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico (OCDE) e da União Europeia, a seguinte definição:

***“Um desregulador endócrino é uma substância ou um composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e tem, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, na sua descendência, ou (sub) populações, sendo definido não pela sua natureza química, mas de acordo com os seus efeitos biológicos”*** [3].

Uma lista preliminar de substâncias e categorias de substâncias para as quais os efeitos de desregulação endócrina foram descritos inclui: metais pesados, alquilfenóis e seus

etoxilatos, ftalatos, o bisfenol-A, alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, numerosos pesticidas e, dentro da categoria dos “esteróides”, as hormonas naturais e sintéticas que, com exclusão dos fitoestrogénios, são decorrentes da poluição do ar, da água e dos solos [4], sendo os sistemas aquáticos importantes veículos de dispersão ambiental destes xenobióticos. No caso dos seres humanos estima-se que mais de 90% dos tóxicos ambientais sejam absorvidos por via digestiva através de alimentos e águas contaminadas, devendo a avaliação do risco consistir na monitorização das concentrações dos tóxicos ambientais, no estudo de biomarcadores de exposição e na avaliação de eventuais factores de susceptibilidade das populações [5].

Desde 1970 que a poluição da água, bem como os problemas emergentes que constituem a eliminação de resíduos perigosos, conduziu à necessidade de implementação de métodos analíticos mais sensíveis e específicos, aumentando a consciência do impacto ambiental destes compostos nos ecossistemas alvo [6].

Os ensaios ecotoxicológicos têm tido um papel fundamental na avaliação e identificação de substâncias químicas poluentes capazes de induzir comportamentos patológicos. Actualmente, os resultados obtidos através de ensaios laboratoriais e de estudos de biomonitorização, levaram ao estabelecimento de associações estatísticas e presumíveis associações de causalidade entre o aumento dos efeitos adversos na saúde humana e espécies selvagens, e a acção desreguladora endócrina de determinadas substâncias químicas [7-10].

Com o propósito de obter uma estimativa rápida da toxicidade de um composto, é possível a utilização de organismos teste sensíveis, para a determinação de concentrações máximas toleráveis, em situações reais de exposição. Resultados obtidos em estudos animais prognosticam muitas vezes efeitos nos humanos, quando estes não podem decorrer experimentalmente [6,11].

A *Daphnia magna* é um crustáceo que se encontra amplamente distribuído em ambientes de água doce. Devido à sua sensibilidade e natureza cosmopolita, é utilizado em estudos de ecotoxicidade, como indicador biológico, recomendado em protocolos nacionais e internacionais, embora o seu uso para diagnosticar danos ecológicos seja ainda relativamente escasso [12].

A poluição das águas é raramente consequência da acção de um único composto químico. Os organismos aquáticos são normalmente expostos simultaneamente a numerosas substâncias, que podem interagir de forma antagónica, sinérgica ou aditiva [13,14]. Uma das vantagens da ecotoxicologia aquática é possibilitar o estudo do efeito das interacções entre diferentes compostos de uma amostra, que não são medidos em análises químicas tradicionais, permitindo assim, a implementação da investigação no domínio da avaliação de efeitos tóxicos combinados, resultantes do uso de misturas de diferentes químicos.

## **1.1. Poluentes**

### **1.1.1. Pesticidas**

A utilização de pesticidas remonta aos primórdios da própria agricultura. Uma grande diversidade de químicos foi e continua a ser utilizada com o intuito de controlar as pragas que comprometem a agricultura, com resultados excelentes para as colheitas, mas muitas vezes questionáveis para a biodiversidade [15].

No final do século XIX, alguns pesticidas do grupo dos herbicidas (como a atrazina) foram considerados químicos perfeitos pois não apresentavam toxicidade para os seres humanos, mas afiguravam-se altamente tóxicos para as ervas daninhas que aniquilavam as plantações [16].

### **Atrazina**

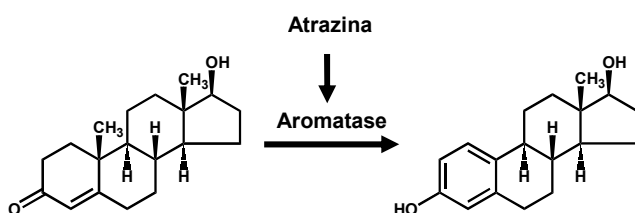
A atrazina apresenta-se actualmente como o pesticida mais utilizado na agricultura em todo o mundo. Sendo este de baixo custo, e portanto muito utilizado pelos agricultores, é hoje designado como o contaminante mais encontrado no solo e na água potável. Baseando-se em cerca de 150 estudos publicados em 2003, a Agência para a Protecção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA) considerou preocupante a poluição pela atrazina, enumerando uma grande variedade de riscos e efeitos potencialmente relevantes para a saúde humana. Hoje em dia, a EPA continua a considerar todas as

pesquisas importantes à luz da ciência actual, bem como uma necessária reavaliação dos potenciais efeitos da atrazina para os ecossistemas [17].

As alterações a nível hormonal são o efeito mais observado em estudos toxicológicos e o ponto mais sensível da toxicidade deste composto [18].

A atrazina é identificada como potente disruptor endócrino mesmo em baixas concentrações. Estudos demonstram que a atrazina provoca a elevação dos níveis de estrogénios e redução dos níveis de androgénios em peixes, anfíbios, répteis e mamíferos (incluindo o ser humano). Na reprodução de anfíbios adultos machos observou-se uma feminização destes organismos, diminuição das glândulas reprodutoras, supressão do comportamento do acasalamento, diminuição de produção de testosterona e diminuição da fertilidade [19]. Outros ensaios revelam um decréscimo da contagem de espermatozóides e espermatozóides viáveis em ratinhos e em humanos, após exposição à atrazina [20]. Foram também observadas em ratinhos, células cancerígenas em vários tecidos e órgãos reprodutores, abortos espontâneos, diminuição do tamanho dos fetos e inibição de células imunitárias [21-24].

O mecanismo, proposto em vários estudos [25,26], que justifica por exemplo a desmasculinização e feminização de espécies de anfíbios, envolve a activação da aromatase, enzima responsável pela conversão de androgénios em estrogénios, verificando-se uma redução da quantidade de testosterona e o aumento da quantidade de estradiol (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismo de acção proposto para o pesticida atrazina em anfíbios, células e tecidos do ser humano, peixes e alguns répteis [25-26].

A nível nacional, os pesticidas sofrem processos de regulamentação cada vez mais restritivos. Nas directivas 80/778/CEE, 98/83/CE referentes à qualidade da água para



consumo humano e 2000/60/CE – Directiva Quadro da Água, as concentrações máximas para pesticidas individuais na água para consumo humano é de 0,1 µg/L, e 0,5 µg/L para pesticidas totais. De acordo com a directiva citada, este composto é considerado como uma “substância perigosa prioritária” para a qual se estabeleceram compromissos com o intuito de suspender a utilização deste químico. [27] Já no regulamento da União Europeia nº 196/2010 da comissão de 9 de Março de 2010, em que está proibida o seu uso como pesticida e retirada de produtos fitofarmacêuticos que contenham esta substância. [28]

### **1.1.2. Estrogénios**

Os estrogénios e os progestagénios são hormonas dotadas de numerosas acções fisiológicas. Nas mulheres estas hormonas influenciam o desenvolvimento, o controlo da ovulação, a preparação do ciclo reprodutor para a fertilização e implantação, bem como aspectos fisiológicos do metabolismo de minerais, hidratos de carbono, proteínas e lípidos. Nos homens, os estrogénios têm acções relevantes sobre os ossos, espermatogénese e no comportamento. Estes são os chamados estrogénios endógenos ou produzidos naturalmente pelo corpo humano. As substâncias sintéticas com actividade estrogénica são denominadas vulgarmente de xenoestrogénios, estrogénios ambientais ou eco-estrogénios.

Os estrogénios naturais também fazem parte da classe dos desreguladores endócrinos. Pesquisas demonstram que os estrogénios estrona e 17β-estradiol são os maiores responsáveis pela actividade estrogénica nos efluentes de estações de tratamento de águas residuais urbanas. Estrogénios naturais também são encontrados em águas naturais, no solo e lodos biológicos em várias partes do mundo [29].

### **Estradiol**

O estradiol (E2 ou 17β-estradiol) é, juntamente com a progesterona, secretado pelos ovários e responsável pelo desenvolvimento de características sexuais femininas secundárias e pela menstruação normal. Tem um impacto maioritário na função sexual e

reprodutiva, mas também noutros órgãos. Relacionado com casos de tromboembolismo venoso, aterosclerose e carcinomas associados, quando administrado em terapias de reposição hormonal [30-32].

A sua presença no meio aquático é atribuída à sua incompleta remoção nos processos de tratamento de esgotos, mostrando induzir uma resposta estrogénica em peixes, em concentrações na água (0,1-1,0 ng/L) muitas vezes mais baixas do que as comumente detectadas no meio ambiente [33].

Segundo um estudo dirigido pela Universidade de Missouri nos Estados Unidos, o estradiol encontrado em águas superficiais em concentrações inferiores a 10 ng/L, conduzia a efeitos adversos nos peixes, verificando-se alterações reprodutivas, indiferenciação sexual e comprometimento de vários órgãos. Neste estudo, os autores advertiam ainda para a hipótese da persistência do estradiol nos sistemas aquíferos, assunto que ainda não se encontra bem esclarecido [34].

Embora vários desreguladores endócrinos se encontrem já regulamentados em directivas comunitárias e legislação nacional para água destinada a consumo humano, outros, como o estradiol, não se encontram incluídos por não existirem ainda evidências suficientes que sirvam de base à indicação de valores paramétricos [35].

Um questionário a nível europeu efectuado em quatro estações de distribuição central de água destinada ao consumo humano identificou concentrações relativamente altas de DEs (excedendo 100 µg/L de estradiol). No entanto, as concentrações encontradas são muito díspares e a exposição a partir da água não é de todo conhecida nos países da União Europeia (UE) [36].

### **1.1.3. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos**

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) constituem um grupo de químicos formado por combustão incompleta de óleo, gás, madeira, lixo e outras substâncias, sendo libertados para a atmosfera e depositados no solo e na água.

Os HAP estão distribuídos amplamente pelo meio ambiente, vulgarmente em misturas e não como compostos simples [37].

A importância destas substâncias é sustentada pelo seu carácter carcinogénico, vasta distribuição no ambiente e alimentos, o que se traduz numa inevitável exposição humana. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são substâncias que apresentam potencial de bioacumulação e actividade estrogénica sendo alguns considerados como DEs [38].

## **Benzo[a]pireno**

O benzo[a]pireno é um hidrocarboneto aromático policíclico que advém maioritariamente dos gases de exaustão de veículos motorizados, do fumo do tabaco e da madeira, além dos alimentos grelhados na brasa [39].

É mutagénico e altamente cancerígeno. Diversos estudos científicos comprovaram a sua associação com a elevada incidência de tumores agressivos no estômago de ratinhos. Testes toxicológicos mais prolongados de exposição ao benzo[a]pireno permitiram ainda verificar que os tumores apresentavam similarmente progressão de metástases na laringe, faringe e esófago. Com outros modelos biológicos, tais como hamsters, os resultados demonstraram incidência de lesões na flora digestiva, que com o aumento da exposição culminavam em tumores [40]. Estudos em primatas evidenciaram lesões tumorais na pele, cérebro, sistema reprodutor e nos rins [41]. Foram também investigados efeitos do benzo[a]pireno nos peixes que apresentaram uma transformação na função endócrina, verificando-se assim um decréscimo do volume dos ovários e um declínio significativo na reprodução [42].

Efeitos genotóxicos foram encontrados em várias células eucarióticas de mamíferos quando expostos a águas contaminadas com HAP. As células apresentavam danos no DNA, verificando-se mutações a vários níveis. Estudos de segurança alimentar revelaram valores elevados de benzo[a]pireno em carnes de churrasco, todo o tipo de *fast food* e grelhados. Amostras de carne cozida e frita apresentavam níveis inferiores mas, mesmo assim, preocupantes para a saúde. Amostras de cereais, verduras e legumes exibiram igualmente contaminação por benzo[a]pireno. Os resultados obtidos suscitaram então a necessidade de estudos epidemiológicos relacionando o consumo regular deste tipo de alimentos e a incidência de tumores [43].

Existem já evidências científicas de alterações endócrinas e aumento da incidência de cancro em pessoas expostas ao benzo[a]pireno através de água de consumo, com valores superiores à concentração máxima exigida pela EPA [44]. Relativamente à legislação portuguesa, o Decreto-Lei nº 306/2007 estabelece como valor paramétrico para o Benzo[a]pireno 0,010 µg/L e para a soma das concentrações do Benzo[b]fluoratenos, Benzo[k]fluoratenos, Benzo[ghi]perileno e Indeno[1,2,3cd]pireno, representativos dos HAP, o valor 0,10 µg/L [45].

## **1.2. Estudos de Ecotoxicidade - *Daphnia magna* como modelo biológico**

A *Daphnia magna* (*D. magna*) ocupa actualmente um lugar de destaque nos ensaios toxicológicos. Encontra-se muito bem estudada e é utilizada em trabalhos de rotina ou investigação como modelo teste. É comumente apelidada de “pulga-da-água”, pertencendo à ordem *Cladocera* e família *Daphniidae* [46].

*D. magna* são representantes fulcrais do zooplâncton do meio aquático de todo o planeta, sendo que são a maior fonte de alimento de outros consumidores de cadeias alimentares superiores. São organismos filtradores, alimentam-se de algas, fungos, cianobactérias e detritos. Tem um ciclo de vida de 2 a 3 meses [47]. Reproduzem-se por partenogénese, não existindo portanto variabilidade genética em reprodução assexuada na proliferação de gerações futuras. Em condições ambientais óptimas atingem a maturidade entre 4 a 7 dias, e só quando se encontram em ambientes menos favoráveis (alteração do pH, temperatura, luminosidade) recorrem à reprodução sexuada, originando machos. A libertação da primeira ninhada geralmente ocorre entre 6 a 10 dias [48].

Biologicamente são designados como sendo organismos pequenos e com um ciclo de vida diminuto. São muito sensíveis a compostos químicos tóxicos o que os torna ideais como modelo em ensaios toxicológicos, permitindo prever o efeito de compostos químicos nos ecossistemas [49].

### 1.2.1. Teste de toxicidade simples vs misturas

Os organismos aquáticos durante todo o seu ciclo de vida, não se encontram expostos a substâncias simples, mas sim a complexas associações de compostos presentes no seu meio ambiente, alguns extremamente tóxicos que contaminam a biota produzindo *cocktails infindáveis de misturas*. Os ensaios toxicológicos avaliam o composto químico, em vários modelos biológicos e em várias concentrações, com o objectivo último de determinar um limite de segurança para o Homem quando exposto [50].

Embora existam numerosos estudos com poluentes individuais, há ainda uma lacuna considerável no que respeita a estudos de comportamento quando vários compostos são testados em mistura. Os compostos em misturas podem apresentar diferentes tipos de interacção, que não ocorrem quando testados isoladamente. Estudos indicam a possibilidade de ocorrência de efeitos de sinergismo (efeito do químico superior ao testado isoladamente) ou efeitos de antagonismo (efeito do químico inferior ao testado isoladamente) em testes de misturas. [51-54]

É, portanto, emergente considerar a importância destes testes associados aos ensaios de toxicidade de compostos químicos isolados, apesar da complexidade a eles inerente.

### 1.3. Objectivos

O presente trabalho académico teve como propósito avaliar o impacto ambiental de três compostos químicos poluentes, considerados desreguladores endócrinos, encontrados por vezes conjuntamente nos nossos ecossistemas: a atrazina, como representante do grupo dos pesticidas; o estradiol, um potente agente hormonal; e o benzo[a]pireno comum nas várias misturas de HAP libertados para o meio ambiente.

Foram realizados ensaios de ecotoxicidade utilizando o organismo teste *Daphnia magna*. Os ensaios de toxicidade aguda decorreram de acordo com normas estabelecidas pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD). Numa primeira abordagem, os três compostos foram testados isoladamente. De seguida, foram testados em mistura como exemplo de mimetização de uma situação real. Pretende-se determinar a concentração estimada (EC) em que um determinado composto causa imobilização (em

percentagem), após exposição num curto espaço de tempo do organismo teste, em ambas as situações estudadas. Posteriormente é avaliada a concentração estimada mais elevada de tóxico, que o organismo se encontra exposto por um período de tempo, que não causa efeitos observáveis (NOEC) nos organismos testados (concentração de tóxico que a resposta observada não é estatisticamente diferente do controlo). Conjuntamente com outros factores, este valor é imprescindível para a determinação do nível de toxicidade permitida pelas organizações governamentais. [55]

## **2. Materiais e métodos**

---

---

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Objecto e Local do estudo**

O ensaio toxicológico de três compostos desreguladores endócrinos foi conduzido com o organismo teste *Daphnia magna* Straus, do clone K originalmente obtido pela Bayer® (Bélgica) e cultivado durante vários anos nos laboratórios da Universidade de Aveiro.

Os estudos toxicológicos agudos foram realizados no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P. (INSA, I.P.), Departamento de Saúde Ambiental, Unidade de Água e Solo, Laboratório de Química e Toxicologia do Porto.

### **2.2. Manutenção e cultivo de *Daphnia magna***

As *D. magna* foram mantidas cerca de dois meses em cultivo, a uma temperatura controlada de 18° - 22°C, fotoperíodo de 16 h luz e 8 h escuro, em grupos de  $\pm 15$  fêmeas, em recipientes de 1000 mL com meio de cultura sintético de *água dura*, ASTM [56]. Este meio de cultura é enriquecido com vitaminas e aditivo orgânico, essenciais a uma óptima manutenção das culturas. O meio de cultura foi renovado 3 vezes por semana. Diariamente, foram alimentadas com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* ( $5 \times 10^5$  cells/ml) [57], também cedida inicialmente pela Universidade de Aveiro, e depois cultivada nos laboratórios de Parasitologia do INSA, I.P.

### **2.3. Testes toxicológicos agudos**

#### **2.3.1. Condições do método**

A metodologia foi implementada de acordo com o guia da OECD 202 para o teste agudo de imobilização de *Daphnia sp.* [58].



Os compostos químicos testados neste trabalho foram a atrazina ( $C_8H_{14}ClN_5$ ), CAS n.º 1912-24-9 da Merck® (Darmstadt, Alemanha); estradiol ( $C_{18}H_{24}O_2$ ), CAS n.º 50-28-2 da Sigma-Aldrich® (Steinheim, Alemanha) e benzo[a]pireno ( $C_{20}H_{12}$ ), CAS n.º 50-32-8 também da Sigma. A água ultra-pura ( $0,054 \mu S/cm$ ) utilizada foi obtida através de um sistema Milli-Q da Millipore® (Milford, MA, EUA). O meio de *água dura* sintética, ASTM, [59] foi utilizado como meio de cultivo para *D. magna* seguindo recomendações descritas em procedimentos padronizados [60,61]. São constituintes do meio ASTM: sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ); carbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ); cloreto de potássio (KCl) e sulfato de cálcio di-hidratado ( $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ ). Estes reagentes foram adquiridos à Merck® (Darmstadt, Alemanha).

O meio de cultura para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, Woods Hole MBL, fornece todos os micro e macronutrientes indispensáveis para o seu crescimento. Os macronutrientes são: cloreto de cálcio di-hidratado ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ), fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ ), nitrato de sódio ( $NaNO_3$ ) e metasilicato de sódio penta-hidratado ( $NaSiO_3 \cdot 9H_2O$ ). Estes macronutrientes foram obtidos à Prolabo® (Bélgica). Os micronutrientes cloreto de ferro hexa-hidratado ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ), sulfato de cobre (II) penta-hidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), sulfato de zinco hepta-hidratado ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), cloreto de cobalto hexa-hidratado ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ), cloreto de manganês tetra-hidratado ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ), molibdato de sódio di-hidratado ( $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ ) e tris(hidroximetil)aminometano foram adquiridos igualmente à Prolabo® (Bélgica). As vitaminas utilizadas no meio de cultura MBL, tiamina, cianocobalamina e biotina foram obtidos à Merck® (Darmstadt, Alemanha).

### 2.3.2. Testes agudos de imobilização – OECD 202

Como referido anteriormente, os testes de imobilização prosseguiram conforme descrito no protocolo padronizado da OECD 202 (OECD, 2004) [58].

As *D. magna* com idade inferior a 24 horas, foram expostas às substâncias teste, numa gama de concentrações definidas (cinco ensaios com cinco replicas cada, cinco *D. magna*

em cada ensaio), por um período de 48 horas. A imobilização foi registada às 24 horas e 48 horas e comparada com observações do controlo.

Os resultados obtidos permitiram a determinação do EC<sub>50</sub> para cada composto (concentração efectiva em que 50% das *D. magna* se encontram imóveis).

Como critério de validação, o controlo não deveria exceder os 10% de imobilização e a concentração de oxigénio dissolvido no final do ensaio deveria ser superior a 3 mg/L no controlo e soluções teste. Também foi executado um teste de toxicidade aguda (antes da realização dos ensaios simples e de mistura) pelo período de 24 horas, utilizando um químico de referência, o dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), para assegurar que o organismo teste se encontrava em condições apropriadas para a realização dos ensaios, assegurando as condições descritas nas normas das organizações internacionais para a padronização (ISO)[62].

#### **2.3.2.1. Ensaio simples**

Para o ensaio agudo simples, utilizaram-se matrizes de vidro de 50 mL, tendo sido testadas cinco concentrações, com cinco indivíduos e cinco réplicas cada concentração. A temperatura foi mantida a 20°C ± 1°C, sem adição de alimento, em fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro e sem renovação do meio. Os parâmetros químicos pH, oxigénio dissolvido, carbono orgânico total, dureza total e condutividade foram analisados diariamente e mantidos segundo critérios descritos na OECD 202.

Cada matraz foi observado e o número de organismos imóveis após 15 segundos de agitação suave, contabilizado. Não foi considerado válido o movimento das antenas de *D. magna* quando estas permaneceram imóveis. Posteriormente, procedeu-se ao cálculo do EC<sub>50</sub> após 48 horas [58].

Na tabela seguinte (tabela 1) encontram-se descritas as concentrações utilizadas no teste agudo de imobilização simples.

**Tabela 3** Concentrações de atrazina, estradiol e benzo[a]pireno utilizadas para o ensaio toxicológico agudo simples com *Daphnia magna*.

Atrazina (mg/L)	Estradiol (mg/L)	benzo[a]pireno (mg/L)
2,0	1,0	0,1
4,0	2,0	0,2
6,0	3,0	0,3
8,0	4,0	0,4
10,0	5,0	0,5

#### **2.3.2.2. Ensaio em misturas**

O ensaio agudo em misturas, foi realizado de acordo com as orientações da OECD para ensaio agudo de imobilização, OECD 202 (OECD, 2004) referido anteriormente. As concentrações individuais dos compostos nas misturas estudadas foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos nos ensaios simples. Inicialmente, as concentrações foram semelhantes. No entanto, no decorrer do ensaio, essas concentrações foram sendo ajustadas até à obtenção de *Daphnia magna* móveis nas concentrações mais baixas da mistura e imóveis nas concentrações mais elevadas.

Na tabela seguinte (tabela 2) encontram-se descritas as concentrações utilizadas no teste agudo de imobilização em mistura.

**Tabela 2.** Concentrações de atrazina, estradiol e benzo[a]pireno utilizadas para o ensaio toxicológico em mistura com *Daphnia magna*.

Atrazina (mg/L)	Estradiol (mg/L)	benzo[a]pireno (mg/L)	
0,03	0,01	0,05	1ª Mistura
0,04	0,02	0,06	2ª Mistura
0,05	0,03	0,07	3ª Mistura
0,06	0,04	0,08	4ª Mistura
0,07	0,05	0,09	5ª Mistura

Decorridas 48 horas de ensaio, qualquer anormalidade comportamental ou biológica foi registada bem como o cálculo do EC<sub>50</sub> para cada composto em mistura. Os ensaios decorreram em conformidade com o descrito (volume utilizado, temperatura, fotoperíodo, alimento e parâmetros químicos). Sucedido este estudo experimental, *D. magna* referente ao controlo e 1ª mistura, foram transferidas para meio ASTM, procedendo-se à uma manutenção de culturas conforme descrito. Após 14 dias, foram verificadas ao microscópio óptico, alterações na integridade biológica de *D. magna* em ambas as situações.

## 2.4. Análise estatística

A análise estatística bem como os gráficos apresentados foram realizados aplicando o software Microsoft Office Excel (2007). O teste *t-Student* foi empregue para verificar as diferenças dos valores de EC verificados nos ensaios simples e na exposição dos ensaios de misturas. Aplicou-se o teste de *Dunnnett* para verificar diferenças entre o controlo e as concentrações testadas. Todas as diferenças significativas dos ensaios foram apresentados através da condição  $p < 0,05$ .

### **3. Resultados**

---

---

### 3. Resultados

Todas as variáveis da qualidade do meio de cultura utilizado para ensaios simples e em misturas foram monitorizados ao longo do estudo. Estes requisitos encontram-se de acordo com o guia da OECD para testes de toxicidade aguda. O grupo do controlo teve 100% de sobrevivência em cada teste. O teste de toxicidade aguda com dicromato de potássio ( $K_2CrO_4$ ) antes dos ensaios simples e antes dos ensaios em mistura, revelaram um  $EC_{50}$  após exposição de 24 horas de 1,1 ( $\pm 0,1$ ) mg/L e 1,4 ( $\pm 0,05$ ) mg/L, respectivamente (intervalo estipulado pela ISO 6341: 0,6 mg/L a 2,1 mg/L); revelando que as *Daphnia magna* utilizadas se encontravam em boas condições para a execução dos ensaios.

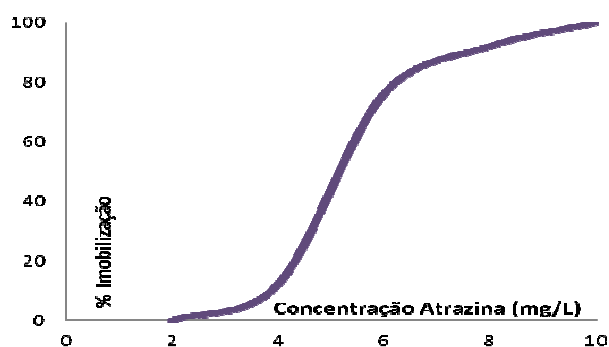


**Figura 2.** Ensaio de toxicidade aguda com dicromato de potássio ( $K_2CrO_4$ ) estipulado pela ISO 6341.

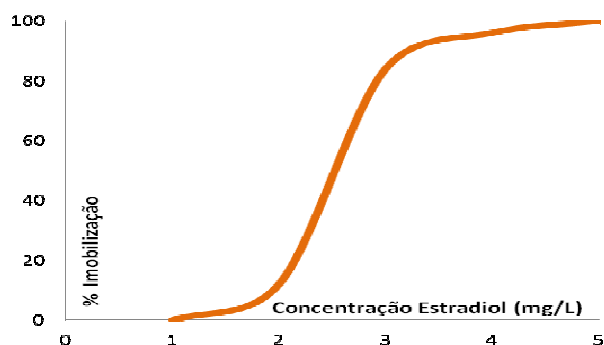
#### 3.1. Teste agudo – ensaio simples

Após a aprendizagem efectuada numa revisão bibliográfica prévia, para a obtenção do  $EC_{50}$  encontrado em outros estudos de investigação, a mesma permitiu a primeira abordagem para a definição das concentrações-alvo utilizadas neste ensaio. Para conduzir os ensaios simples, inicialmente foram testadas gamas de concentrações

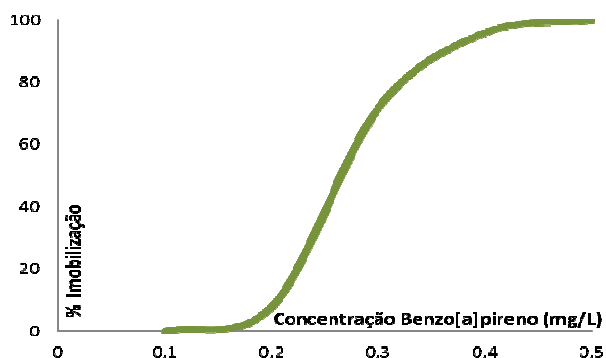
geometricamente organizadas com factor de 5 para as substâncias em estudo. Após término deste ensaio, os resultados permitiram recalcular as concentrações num factor não excedendo 2.2, de acordo com as directrizes estipuladas pelo guia da OECD 202 (2004). Nestes ensaios simples, foram determinadas as concentrações estimadas de atrazina, estradiol e benzo[a]pireno capazes de imobilizar 50% de *D. magna* decorridas 48 horas de teste (EC<sub>50</sub>). Nas figuras 3, 4 e 5 encontram-se as curvas de concentração-resposta para cada composto, respectivamente, sendo a resposta traduzida como a redução da mobilidade observada no organismo teste (% de imobilização).



**Figura 3.** Concentração resposta para a atrazina no ensaio simples com *D. magna*.



**Figura 4.** Concentração resposta para o estradiol no ensaio simples com *D. magna*.



**Figura 5.** Concentração resposta para o benzo[a]pireno no ensaio simples com *D. magna*.

O valor de EC<sub>50</sub> observado para a atrazina foi de 5,57 ( $\pm 0,12$ ) mg/L, o EC<sub>5</sub> obtido foi de 2,36 mg/L e o EC<sub>90</sub> de 8,43 mg/L. Para o estradiol, o EC<sub>50</sub> foi de 2,70 ( $\pm 0,09$ ) mg/L, o EC<sub>5</sub> de 1,12 mg/L e o EC<sub>90</sub> de 4,11 mg/L. O valor de EC<sub>50</sub> para o benzo[a]pireno foi de 0,28 ( $\pm 0,03$ ) mg/L, o EC<sub>5</sub> de 0,13 mg/L e o EC<sub>90</sub> de 0,42 mg/L.

Os resultados demonstraram que o benzo[a]pireno apresentou maior toxicidade em *D. magna* e a atrazina o efeito tóxico menor.

Na tabela seguinte (tabela 4.) encontram-se compilados os valores de EC<sub>50</sub> obtidos neste ensaio toxicológico, bem como a concentração sem efeito observado (NOEC) para cada composto conforme literatura, os valores de EC<sub>50</sub> revisto por revisão bibliográfica e os respectivos valores paramétricos (VP) aplicáveis no que respeita à qualidade da água para consumo humano (Dec.-Lei 306/07).

**Tabela 3.** Comparação entre valores de EC<sub>50</sub> observados, EC<sub>50</sub> após compilação de dados de revisão bibliográfica, NOECs e valores paramétricos (VP) para cada composto estudado.

Composto	EC <sub>50</sub> observado (mg/L)	NOEC (mg/L)	EC <sub>50</sub> revisto (mg/L)	VP (Dec.Lei 306/07) (mg/L)
<b>Atrazina</b>	5,57	1,18[63]	6,9[63]	0,0001 (pesticida individual)
<b>Estradiol</b>	2,70	0,56[64]	2,87[64]	Não aplicável
<b>Benzo[a]pireno</b>	0,28	0,07[65]	0,3[65]	0,00001 (PAH individual)



### 3.2. Teste agudo – ensaio em misturas

Ao iniciar os ensaios de misturas, foi definido como concentração máxima utilizada o EC<sub>50</sub> calculado nos ensaios simples (5,57 mg/L para a atrazina, 2,27 mg/L para o estradiol e 0,28 mg/L para o benzo[a]pireno).

Dando seguimento ao mesmo ensaio e utilizando concentrações proporcionalmente decrescentes, ajustou-se a melhor gama de concentrações na mistura dos três compostos alvo; obtendo-se assim *D. magna* vivas em concentrações mais baixas e imóveis em concentrações mais altas.



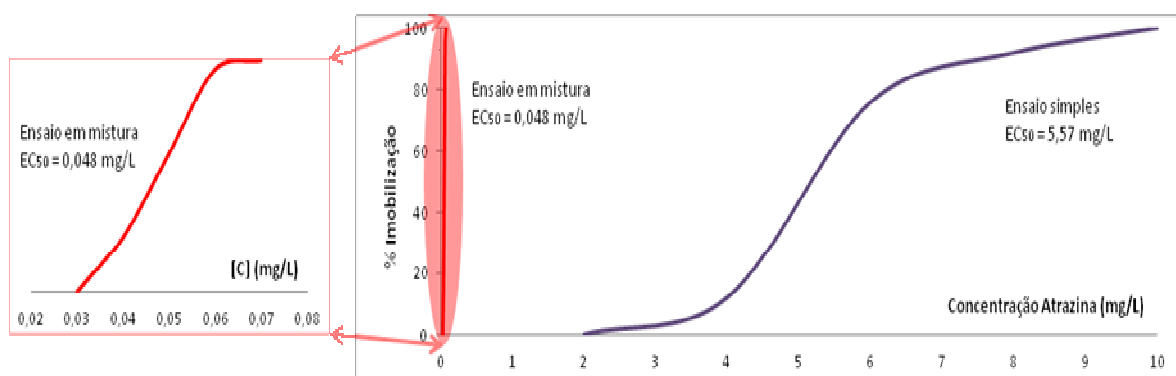
**Figura 6.** Ensaio toxicológico agudo utilizado na obtenção da gama de concentrações finais para a implementação do ensaio em mistura dos três compostos.

Os resultados observados através das curvas de concentração-resposta para a mistura das substâncias em estudo (atrazina, estradiol e benzo[a]pireno), demonstraram uma diminuição significativa dos valores de EC ( $p < 0,05$ ) relativamente aos ensaios simples. As figuras 7, 8 e 9 demonstram a comparação entre as curvas de concentração resposta obtidas em ensaios simples e em misturas, bem como o cálculo do EC<sub>50</sub> respectivamente.

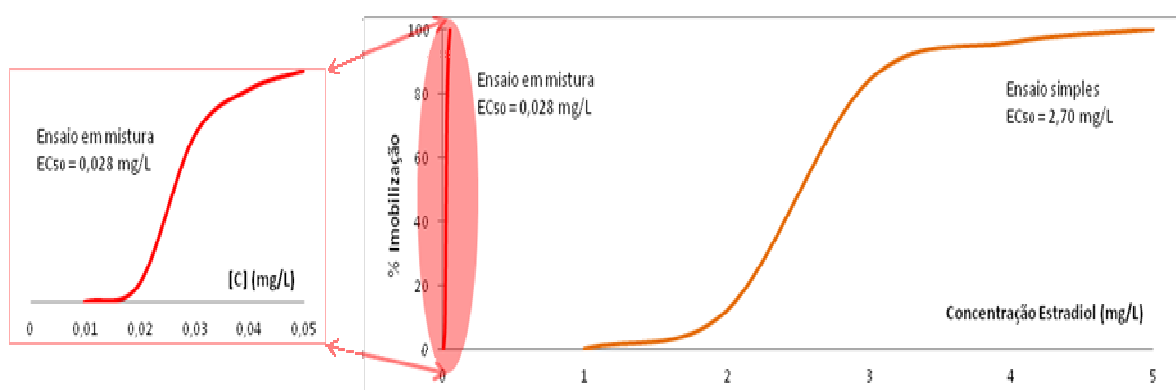
O maior aumento de efeito de toxicidade foi observado na Atrazina. O EC<sub>50</sub> passou de 5,57 mg/L no ensaio simples para 0,048 mg/L em mistura. Este facto implica um aumento superior a 99% da toxicidade quando o composto é testado em mistura.

O EC<sub>5</sub> para a atrazina variou de 2,36 mg/L no ensaio simples para 0,031 mg/L no ensaio de mistura; e o EC<sub>90</sub> de 8,43 mg/L para 0,063 mg/L. O aumento de toxicidade verificado para o EC<sub>5</sub> e o EC<sub>90</sub> foi superior a 90%.

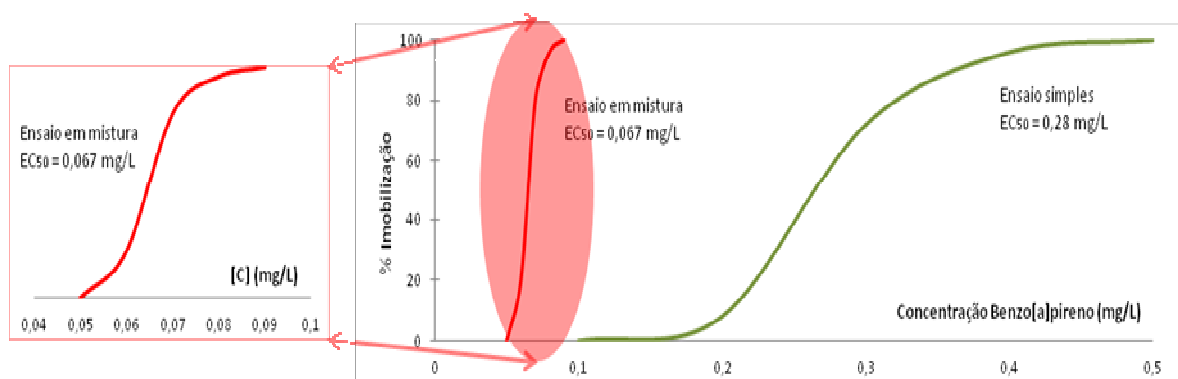
Para o composto estradiol, o EC<sub>50</sub> decresceu de 2,70 mg/L no ensaio simples para 0,028 mg/L em mistura. O EC<sub>5</sub> observado modificou de 1,12 mg/L para 0,013 mg/L e o EC<sub>90</sub> de 4,11 mg/L para 0,043 mg/L. O aumento de toxicidade verificado no caso do estradiol para o EC<sub>5</sub>, EC<sub>50</sub> e EC<sub>90</sub> foi superior a 90%. Relativamente ao benzo[a]pireno, o EC<sub>50</sub> diminuiu de 0,28 mg/L no ensaio simples para 0,067 mg/L no ensaio de mistura. O EC<sub>5</sub> alterou de 0,13 mg/L para 0,05 mg/L e o EC<sub>90</sub> de 0,42 mg/L para 0,08 mg/L. O aumento de toxicidade verificado no benzo[a]pireno para o EC<sub>5</sub>, EC<sub>50</sub> e EC<sub>90</sub> foi de 60%, 76% e 80%, respectivamente. Verificou-se portanto, neste caso, o menor efeito de toxicidade quando comparados os valores obtidos de EC<sub>50</sub> nos ensaios simples e em mistura. Estes resultados demonstraram que existem diferenças consideráveis entre a exposição de *D. magna* a uma substância simples e a misturas dos três compostos analisados.



**Figura 7.** Comparação entre EC<sub>50</sub> obtido no ensaio simples e em mistura para a atrazina.

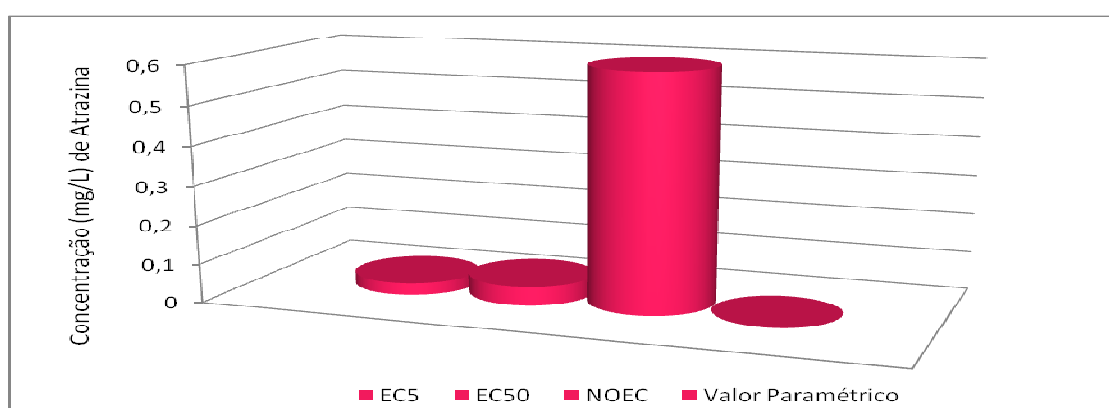


**Figura 8.** Comparação entre EC<sub>50</sub> obtido no ensaio simples e em mistura para o estradiol.

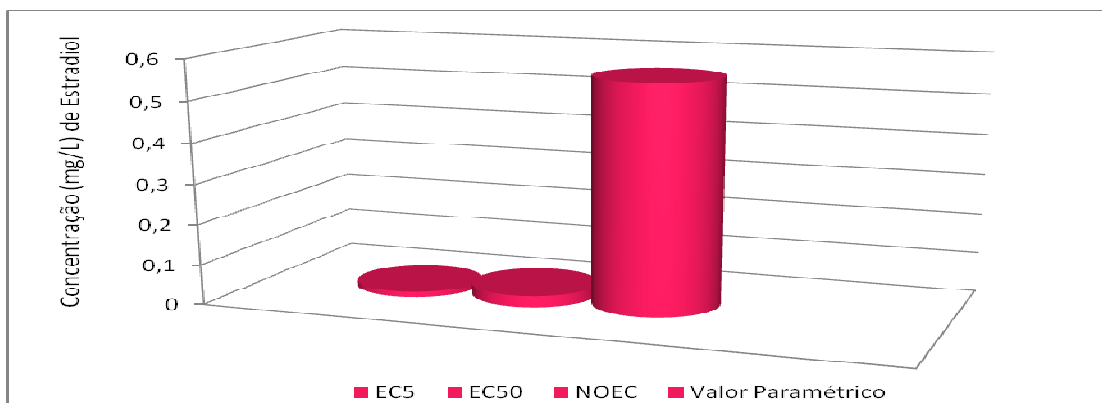


**Figura 9.** Comparação entre EC<sub>50</sub> obtido no ensaio simples e em mistura para o benzo[a]pireno.

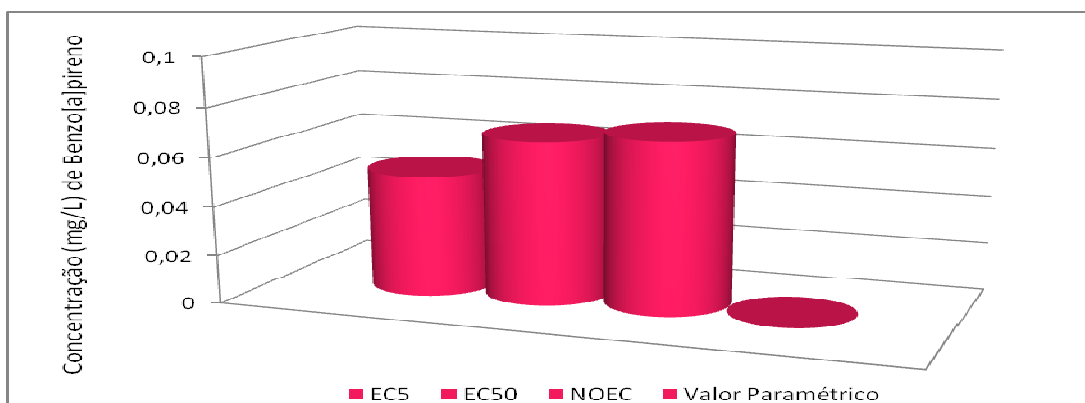
Na figura 10, encontram-se representadas as concentrações de EC<sub>5</sub> e EC<sub>50</sub> calculadas nos testes de mistura, os valores paramétricos para os compostos em estudo e os valores das concentrações sem efeito observado estatisticamente (NOEC) obtidas nos ensaios simples ( $p < 0,05$ ). Estes estudos comparativos são importantes servindo de base ao cálculo dos “*limites seguros permitidos*” apresentados por organizações como a EPA [55]. Verifica-se que as NOEC são superiores às concentrações EC<sub>5</sub> e EC<sub>50</sub> para a atrazina, estradiol e benzo[a]pireno quando em mistura. No entanto, os VP são inferiores às concentrações obtidas para EC<sub>5</sub>, já definido anteriormente, para a atrazina e benzo[a]pireno. Relativamente ao estradiol, não existe ainda legislação aplicável definida nem valores paramétricos que estabelecem um limite de segurança para o Homem.



**Figura 10.** Comparação entre valores de EC<sub>5</sub> E EC<sub>50</sub> obtidos nos ensaios com misturas, o NOEC obtido através de ensaios simples e o valor paramétrico para a atrazina.



**Figura 11.** Comparação entre valores de EC<sub>5</sub> E EC<sub>50</sub> obtidos nos ensaios com misturas, o NOEC obtido através de ensaios simples e o valor paramétrico para o estradiol.

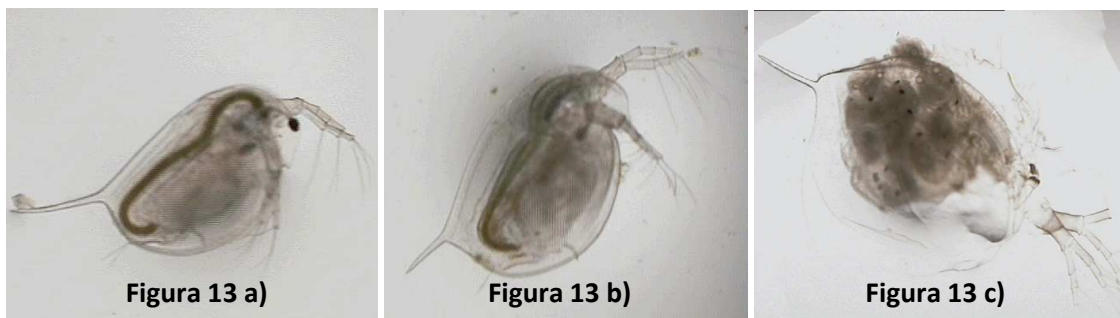


**Figura 12.** Comparação entre valores de EC<sub>5</sub> E EC<sub>50</sub> obtidos nos ensaios com misturas, o NOEC obtido através de ensaios simples e o valor paramétrico para o benzo[a]pireno.

Decorridas 48 horas de exposição dos ensaios toxicológicos agudos das misturas; os cinco matrizes relativos ao controlo e os cinco matrizes relativos às concentrações de 0,03 mg/L para a atrazina, 0,01 mg/L para o estradiol e 0,05 mg/L para o benzo[a]pireno (1ª mistura); foram retiradas as *D. magna* que se encontravam vivas, e transferidas para matrizes com meio de cultura ASTM, (cinco replicados, cinco indivíduos cada) por um período de 14 dias. No decorrer desse período, as *D. magna* foram alimentadas diariamente com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, o meio de cultura foi renovado 3 vezes por semana e em foto-período de 16 h luz e 8 h escuro; obedecendo aos protocolos para a manutenção e cultura de *D. magna* em laboratório. Após os 16 dias, as *D. magna* do controlo (48 horas mais 14 dias em meio ASTM) e da 1ª mistura (48 horas de teste

agudo com exposição a mistura de químicos mais 14 dias em meio ASTM) foram observadas ao microscópico óptico, para verificar a sua integridade biológica.

As figuras seguintes (13 a), b) e c)) revelam as observações de *D. magna*, ao microscópio óptico (MO), após 48 de estudo toxicológico agudo e 14 dias em meio ASTM.



**Figura 13 a), b), e c).** Figura 13 a) *D. magna*, exposta durante 48 horas e 14 dias em meio ASTM. Na figura 13 b) verifica-se, após exposição de 48 horas em teste agudo (mistura de químicos) e 14 dias em meio ASTM, a ausência da região ocular. Na figura 13 c) exposta nas mesmas condições que a figura 13 b), verificam-se embriões abortados no interior de *D. magna* após a sua morte.

Em comparação com o controlo (figura 13), foi possível observar na figura 13 a), uma malformação a nível ocular (ponto negro encontra-se ausente ou em tamanho reduzido) e na Figura 13 c) visualiza-se *D. magna* com embriões abortados (embriões já com formação ocular) após a morte da progenitora. Estas observações são consistentes com um estudo desenvolvido na Alemanha em que *D. magna* foi exposta a um *cocktail* de misturas com desreguladores endócrinos e fungicidas [66].

## 4. Discussão

---

---

## 4. Discussão

O teste de toxicidade com dicromato de potássio após uma exposição de 24 horas foi realizado inicialmente (antes dos ensaios simples e de mistura), tendo revelado resultados satisfatórios quanto à qualidade de *D. magna*. O intervalo estipulado pela ISO 6341 alberga o valor obtido de EC<sub>50</sub> 1,1 mg/L e 1,4 mg/L, respectivamente.

Os testes toxicológicos agudos foram depois conduzidos para os três compostos em estudo. Para o benzo[a]pireno, testado no ensaio simples e de concentrações entre 0,1 mg/L e 0,5mg/L, foi observado um EC<sub>50</sub> de 0,28mg/L, sendo o composto que apresenta maior toxicidade (quando testado isoladamente) para o microcrustáceo utilizado. O benzo[a]pineno é considerado pela EPA como um dos 16 compostos prioritários, devido ao seu carácter carcinogénico e mutagénico [67].

Relativamente ao estradiol observou-se um EC<sub>50</sub> de 2,70 mg/L, concentração capaz de inibir 50% das *D. magna* testadas. O estradiol apresenta-se como uma das hormonas mais potentes e vastamente distribuída pelo ecossistema. Para além da sua síntese endógena pelo homem e outros animais, é também produzido sinteticamente para ser utilizado em suplementos alimentares ou fármacos de reposição hormonal [68].

Como composto menos tóxico, a atrazina, o herbicida mais utilizado pelo homem na agricultura, detêm um EC<sub>50</sub> de 5,57 mg/L. Através do cálculo do NOEC, a partir de uma associação estatística entre os valores observados no controlo e os valores estatisticamente não considerados significativos ao longo do teste das concentrações, verificou-se que este se encontra descrito de uma maneira plausível e concordante com os valores obtidos para o EC<sub>50</sub> dos três compostos. Sendo assim, não seriam de esperar efeitos adversos no organismo teste, nas concentrações de 1,18 mg/L para a atrazina, 0,56 mg/L para o estradiol e 0,07 mg/L para o benzo[a]pireno, podendo ser categórico um valor seguro para o ambiente, em concentrações desta ordem de concentrações.

Na Europa, os valores paramétricos legislados para água de consumo humano são bastante inferiores aos resultados obtidos ou seja, são considerados seguros para a saúde humana.

Os valores de EC<sub>50</sub> observados neste estudo, encontram-se de acordo com estudos publicados para estes compostos, levando assim a uma maior credibilidade no próprio estudo, e confiança na legislação aplicada.

Em seguida foram realizados os ensaios em misturas que suscitaram a necessidade do aumento de atenção relativamente às conclusões deste tipo de ensaios. Ao colocar os três compostos em mistura (atrazina, estradiol e benzo[a]pireno), estes induziram comportamentos muito diferentes dos observados nos ensaios simples. As *D. magna* que anteriormente tinham apresentado 50% de imobilização aos 5,57mg/L de atrazina no ensaio simples, quando expostas ao mesmo composto em mistura passaram a ter um EC<sub>50</sub>= 0,048 mg/L. Verificou-se, portanto, um aumento considerável de toxicidade, superior a 99%. O estradiol foi o segundo composto a apresentar aumento de toxicidade, exibindo um EC<sub>50</sub> no ensaio simples de 2,70 mg/L e no ensaio de mistura de 0,028 mg/L. O aumento de toxicidade foi superior a 90%. Já o benzo[a]pireno, composto que quando testado nos ensaios simples apresentou a maior toxicidade para *Daphnia magna*, no ensaio de misturas apresentou o menor incremento de toxicidade (inferior a 80%). Passou de um EC<sub>50</sub> no ensaio simples de 0,28 mg/L para 0,067 mg/L.

Face ao exposto, os resultados demonstram que os valores de EC<sub>5</sub> dos ensaios de misturas, que consistem na concentração efectiva que inibe 5 % das *D. magna*, são inferiores aos NOEC obtidos no ensaio simples. Assim, o EC<sub>5</sub> da atrazina, igual a 0,031 mg/L, inibe 5% de *D.magna*, quando não se esperariam efeitos observáveis no organismo teste para concentrações inferiores a 1,18 mg/L.

Um artigo redigido em 1995 pelo Departamento de Estudos dos Ecossistemas na Polónia referiu que a introdução do termo NOEC terá sido o mais sério engano da comunidade ecológica, pois este não é determinado com todas as variáveis que o ecossistema possui



na realidade. Também afirma que os estudos ecotoxicológicos são tão díspares quanto as ideologias políticas e as intervenções monetárias ligadas aos mesmos [69].

O mesmo se aplica aos compostos testados neste estudo. O estradiol exibiu um EC<sub>5</sub> de 0,013 mg/L sendo o NOEC de 0,56 mg/L. O benzo[a]pireno demonstrou um EC<sub>5</sub> de 0,05 mg/L e um NOEC de 0,07 mg/L.

Os ensaios da mistura demonstraram sinergismo de actuação dos compostos em estudo. Os três compostos juntos apresentam maior toxicidade do que quando testados isoladamente.

Na natureza existe uma mistura infindável de compostos, sendo impossível testar todas as combinações em laboratório. No entanto, misturas mais simples, semelhantes às encontradas em amostras ambientais, permitem predizer os efeitos nefastos que podem ter algumas associações de compostos. Esta afirmação é fundamentada pelos resultados obtidos após colocar as *Daphnia magna* em meio de cultura ASTM durante 14 dias, depois de expostas durante 48 horas à mistura de mais baixa concentração. Mesmo já não estando expostas, verificou-se uma anomalia no desenvolvimento ocular e no sistema reprodutor. É demonstrado que os efeitos são bioacumuláveis nas *D. magna*, podendo existir repercussões graves ao nível da sua integridade biológica e funcionamento normal.

Relativamente aos valores paramétricos para águas de consumo humano, estes pretendem assegurar ausência de efeitos nefastos para o Homem. No entanto, o estradiol, ainda continua a ser um composto omissos na legislação e nas directrizes de protecção ambiental e Humana.

No homem, o sistema endócrino é formado por um conjunto de glândulas produtoras de hormonas, a qual estabelece ligação entre o sistema endócrino e o nervoso. Estas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e crescimento, reprodução, diferenciação, formação do sistema nervoso e imunológico. Uma alteração da concentração destas hormonas, podem induzir alteração nas funções e características dos

órgãos e sistemas vitais para o funcionamento homeostático do ser Humano. No entanto, as hormonas não são exclusivas dos seres humanos. Encontram-se na natureza tanto em espécies animais como em espécies vegetais. Os desreguladores endócrinos perturbam portanto o funcionamento do sistema endócrino mimetizando as hormonas naturais, bloqueando os receptores numa célula, activando a síntese e a secreção de hormonas naturais, desactivando enzimas responsáveis pela secreção de hormonas e/ou estimulando a capacidade das hormonas em interagir com os receptores celulares [70]. Uma vez que uma grande parte dos DEs persistentes no meio ambiente actua recorrendo a vários mecanismos, ainda não se chegou a uma conclusão, ou a evidências palpáveis quanto ao estabelecimento de valores paramétricos permitidos por lei. [69-71].

## 5. Conclusão

---

---

## 5. Conclusão

Este trabalho académico teve como objectivo avaliar os efeitos tóxicos de três poluentes (atrazina, estradiol e benzo[a]pireno) isolados e em mistura, simulando uma situação real. Os resultados demonstraram que a avaliação de toxicidade dos compostos não deve ser apenas realizada com cada um dos composto, *per si*, considerando que actua sozinho no meio ambiente, mas sim avaliando interacções com outros compostos igualmente presentes.

O conhecimento científico busca sempre pela sabedoria sendo auxílio no estabelecimento de melhores regulamentações no que concerne aos produtos maioritariamente consumidos pelo Homem como a água. Os resultados demonstraram que se os DEs alvo de estudo testados em mistura e em concentrações mais baixas do que os respectivos NOECs, causaram modificações biológicas na *D. magna*, também existe a possibilidade de que no ambiente possam ser um “*campo de batalha*” para todo o ecossistema. Uma vez que a maior parte dos DEs são persistentes no meio ambiente e bioacumuláveis, torna-se problemático estabelecer uma relação causa-efeito directa para uma determinada substância isolada. Desta forma, é primordial a coordenação a nível nacional e internacional de estudos químicos, toxicológicos e epidemiológicos preditivos em misturas.

Em suma, mais estudos serão necessários para avaliar a toxicidade aguda dos poluentes ambientais, nomeadamente de compostos que apresentam efeitos de desregulação endócrina, complementando assim lacunas existentes no que respeita à legislação regulamentada e, em alguns casos, proceder a uma reavaliação de valores paramétricos e doses máximas permitidas.

## **6. Referências**

---

---

## 6. Referências

- [1] Alda, M.J.L.; Barceló D. - Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 437-447.
- [2] Propper, C.R. - The Study of Endocrine-Disrupting Compounds: Approaches and New Directions. *Integr. Comp. Biol.* 45 (2005) 194-200.
- [3] COM (1999) 706 final - CEC - Commission of the European communities. Community strategy for endocrine disrupters: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Communication from the commission to the council and the European parliament, Brussels, 1999.
- [4] IPCS; *Global Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors*, International Programme on Chemical Safety Report WHO/PCS/EDC/02.2, *World Health Organization (WHO)*, Geneva, Switzerland; Damstra, T.; Barlow, S.; Bergmna, A.; Kavlock, R.; Van Der Kraak, G., eds.; 2002.
- [5] Sumpter, J.P. - Endocrine Desreguladors in the Aquatic Environment: An Overview. *Acta Hydrochim. Hydrobiol* 33(1) (2005) 9-16.
- [6] USEPA. United States Environmental Protection Agency. 2002. Perchlorate Environmental Contamination: Toxicological Review and Risk Characterization based on emerging information. Washington, DC 31, January
- [7] US.EPA, 1997; *Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis*, U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/630/R-96/012, Washington D. C, 1997.

[8] ACSH. Endocrine Disrupters: A Scientific Perspective, *American Council on Science and Health: New York* (1999).

[9] UBA TEXTE, 1996; *Endocrinically Active Chemicals in the Environment*, Biochemical Ecotoxicology Division, Arthur-Scheunert-Aller, 114, 14558 Bergholz-rehbrücke, Germany, USB Texte 3/96, 1996.

[10] OECD; *The Second Meeting of the OECD Validation Management Group (VMG) for the Screening and Testing of Endocrine Disrupters*, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, 2000.

[11] Clesceri, L.; Greenberg A.; Trussell R. - Standard Methods for the examination of water and wastewater, 17<sup>th</sup> Edition, American Public Health Association, Washington, 1989

[12] Westheide, W. Rieger R. (1996). Spezielle zoologie – Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.

[13] Firpo *et al.* *Mixture and single-compound toxicity using daphnia magna* – Comparisons with estimates of concentration addition and independent action. Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Aquatic Sciences and assessment (2011)

[14] Shakya Pooja. Synergism Synergism and Antagonism in Toxicity of Mixtures of Pharmaceuticals to *Daphnia magna*. Senior Theses, Trinity College, Hartford, CT 2011.

[15] DELAPLANE, K. S. *Pesticide usage in the United States: history, benefits, risks, and trends*, 2000.

[16] Baird C. Cann M. 2005. Pesticides. Environmental chemistry 3rd edition. W.H Freeman and Company, p 341.

[17] Revised, A., Blair, A. and Fraumeni, J. (1996). Agricultural herbicide use and risk of lymphoma and soft-tissue sarcoma. *Journal of American Medicinal Association* 256: 1141-1147.

- [18] USEPA. United States Environmental Protection Agency. 2011. Atrazine Updates: Atrazine evaluation process. Washington, DC September 2011
- [19] Hayes et al., Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*), Laboratory for Integrative Studies in Amphibian Biology, University of California, Berkeley, CA 94720-3140; August 20, 2009)
- [20] Kniewald, J. Jakominic, M. and Tomljenovic, A. (2000). Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. *Journal Applied Toxicology* 20: 61-68.
- [21] Whalen, M., et al., Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides. *Chemico-Biological Interactions*, 2003. 145(3): p. 311-319.
- [22] Zeljezic, D., et al., Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicol. In Vitro*, 2006. 20(6): p. 923-935.
- [23] Mizota, K. and H. Ueda, Endocrine disrupting chemical atrazine causes degranulation through G(q/11) protein-coupled neurosteroid receptor in mast cells. *Toxicol. Sci.*, 2006. 90(2): p. 362-368.
- [24] Hooghe, R., S. Devos, and E. Hooghe-Peters, Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sciences*, 2000. 66(26): p. 2519-2525.
- [25] Sanderson, J. T.; Letcher, R. J.; Heneweer, M.; Giesy, J. P.; Van Den Berg, M. - Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environmental Health Perspectives* 109 (2001) 1027-1031.
- [26] Hayes, T. B.; Stuart, A. A.; Mendoza, M.; Collins, A.; Noriega, N.; Vonk, A.; Johnston, G.; Liu, R.; Kpodzo, D. – Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and Comparisons with effects of an androgen antagonist (Cyproterone Acetate) and exogenous estrogen (17 $\beta$ -Estradiol): Support for



the demasculinization/feminization hypothesis. *Environmental Health Perspectives* 114(1) (2006) 134-141.

[27] WATECO, e CE. (2003) *Metodologia de aplicação da directiva do quadro da água*. Lisboa, Instituto da Água, Ministério das Cidades, Ordenamento do Território e Ambiente.

[28] Regulamento União Europeia nº 196/2010 da comissão de 9 de Março de 2010 – *Exportação e importação de produtos químicos perigosos*. Bruxelas, 9 de Março de 2010.

[29] Daniele Maia Bila; Márcia Dezotti. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Quím. Nova* vol.30 no.3 São Paulo May/June 2007).

[30] Høibraaten E. *et al.* Hormone Replacement Therapy with Estradiol and Risk of Venous Thromboembolism A Population-based Case-control Study. *Department of Haematology, Haematological Research Laboratory, Section of Epidemiology, Research Forum, Ullevål University Hospital, Oslo, Norway (1999)*

[31] Barrett-Connor E. *et al.*, Low Levels of Estradiol Are Associated with Vertebral Fractures in Older Men, But Not Women: The Rancho Bernardo Study, Department of Family and Preventive Medicine, Division of Epidemiology, School of Medicine, University of California (2000)

[32] Ellis MJ. *et al.* Lower-dose vs high-dose oral estradiol therapy of hormone receptor-positive, aromatase inhibitor-resistant advanced breast cancer: a phase 2 randomized study. Department of Medicine, Division of Oncology, Washington University School of Medicine, St Louis, USA (2009)

[33] DESBROW, C., ROUTLEDGE, E. J., BRIGHTY, G. C., 1998 "Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening" *Environmental Science Technology* v. 32 (11), pp. 1549-1558)

[34] Peterson E. *et al.*; Persistence of 17  $\beta$ -Estradiol in Water and Sediment-Pore Water from Cave Streams in Central Missouri; *Department of Geological Sciences, University of Missouri, Columbia, (2005)*

- [35] Czaja J. *et al.* Independent effects of estradiol on water and food intake. *Behav Neurosci.* (1983)
- [36] Wenzel A. *et al.* Study on endocrine disrupters in drinking water. Final report ENV.D.1/ETU/2000/0083; Schmollenberg and Wiesbaden, February (2003).
- [37] EPA. 1980a. Ambient water quality criteria document for polynuclear aromatic hydrocarbons. Cincinnati, OH: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office. EPA 440/5-8-069.
- [38] U.S. EPA. 1991a. Drinking Water Criteria Document for PAH. Prepared by the Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH for the Office of Water Regulations and Standards, Washington, DC.
- [39] IARC (International Agency for Research on Cancer). 1983. Certain Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heterocyclic Compounds. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of the Chemical to Man, Vol. 3. Lyon, France.
- [40] U.S. EPA. 1991b. Dose-Response Analysis of Ingested Benzo[a]pyrene (CAS No. 50-32-8). Human Health Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment, Washington, DC. EPA/600/R-92/045.
- [41] Knauf, L. and G. Rice. 1992. Statistical Evaluation of Several Benzo[a]pyrene Bioassays. Memorandum to R. Schoeny, U.S. EPA, Cincinnati, OH. January 2.
- [42] EPA. 2011. Ambient water quality criteria document Benzo[a]pyrene. Cincinnati, OH: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office.
- [43] Kazerouni N. *et al.* Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Rockville, USA. Food Chem Toxicol. (2001)

- [44] EPA. 2006. Benzo[a]pyrene – Water criteria. Cincinnati, OH: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office.
- [45] Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto de 2007 – Ministério do Ambiente, do Ornamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Diário da República, 1ª. Série – nº 164.
- [46] Westheide, W. Rieger R. (1996). Spezielle zoologie – Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.
- [47] Pieters, B. J. (2007). Daphnid population – Influence of food limitation on the effects of fenvalerate pulse exposure on the life history and population growth rate. Environmental Toxicology and Chemistry, 24, 2254-2259.
- [48] Adema D.M.M. 1978. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. Hydrobiologia 59: 125-134.
- [49] Iten Berge W.T. 1978. Breeding *Daphnia magna*. Hydrobiologia 59: 121-123.
- [50] Loureiro, S., Amorim, M.J.B., Campos, B., Rodrigues, S.M.G., Soares, A.M.V.M., 2009. Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae) and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda) using avoidance behaviour as an endpoint. Environmental Pollution 157, 625-636.
- [51] Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. Annals of Applied Biology 26 (3), 585-615.
- [52] Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Über Kombinationswirkungen. Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 114 (5), 313-326.
- [53] Backhaus, T., Altenburger, R., Arrhenius, A., Blanck, H., Faust, M., Finizio, A., Gramatica, P., Grote, M., Junghans, M., Meyer, W., Pavan, M., Porsbring, T., Scholze, M., Todeschini, R., Vighi, M., Walter, H., Grimme, L.H., 2003. The BEAMproject: prediction

and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. Continental Shelf Research 23 (17e19), 1757e1769.

[54] Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture doseeresponse analysis. Environmental Toxicology and Chemistry 24 (10), 2701e2713.

[55] EPA, 1994. Short-term methods for estimating chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms (3<sup>rd</sup> Ed.) EPA/600/4-91/002 (July, 1994) Section 9.1.1.2; pg. 44.

[56] ASTM, 1998. Standard Practice for Conducting toxicity tests with fishes, microinvertebrates and Amphibians. E 729-90., Annual Book of ASTM Standards. ASTM (American Society for Testing Materials), Philadelphia, PA, 271-296.

[57] Baird, DJ, Smith, AMVM, Girling, A., Barber, I., Bradley MC, Calow, P., 1989. The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. In: Lokke, H., tyle, H., Bro-Rasmussen, F. (Eds.), Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology. Lyngby, Danmark and pp. 144-148.

[58] OECD 202, 2004. Organization For Economic Co-Oeperation And Development. Revised Proposal for updating Guidelines 202. *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. Revised Draft Document. April, 1-12.

[59] ASTM (2001) Standard Practice for Conducting toxicity tests with microinvertebrates and Amphibians, vol 11.06. ASTM. E 729-90. American Society for Testing and Materials, Philadelphia

[60] OECD (2004) Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test OECD Publishing,

[61] OECD (1998) Guideline 211. *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD Publishing,

[62] ISO 6341:1996 Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) - Acute toxicity test.

- [63] Candy Brassard, M.A., Lauren Gill, Ann Stavola, M.S., James Lin Ph.D, and Larry Turner, Ph.D. – Atrazine. Analysis of Risks Endangered and Threatened Salmon and Steelhead Trout July 27. Policy and Regulatory Services Branch and Environmental Field Branch Field and External Affairs Division and Environmental Fate and Effects Division. EUA (2003)
- [64] Sarah J Brennan, Concepta A Brougham, James J Roche, Andrew M Fogarty. Multigenerational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. Chemosphere (2006) Volume: 64, Issue: 1, Pages: 49-55 PubMed: 16405951
- [65] WHO World Health Organization (2011) *New and emerging scientific issues for chemicals assessment in benzo(a)pyrene*. Switzerland, 2011
- [66] Enken Hassold, *Chronic toxicity of endocrine disruptors to the crustacean Daphnia magna under complex exposure situations*. Alemanha, Agosto de 2009
- [67] Barata C, Baird DJ. 2000. Determining the ecotoxicological mode of action of toxicants from measurements on individuals: results from short duration chronic tests with *Daphnia magna* Straus. Aquatic Toxicology 48(2-3):195-209.
- [68] Boyd GR, Palmer JB, Grimm DA. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA.
- [69] Guillette LJ, Crain DA, Rooney AA, Pickford DB. Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. Environ Health Perspect 1995;103(Suppl 7):157–64.
- [70] Lutz I, Kloas W. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. Sci Total Environ 1999;225:4957.
- [71] Bowmer TB. Environmental risk assessment of endocrine active substances—a reality? International symposium on environmental endocrine disruptors. 1999. p. 85–8.
-